

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number : 57-149301

(43) Date of publication of application : 14.09.1982

(51) Int.CI.

C08B 37/00
A23L 1/00
A61K 31/715
A61K 31/715
A61K 31/715
G01N 31/00
// C12P 19/04
C12R 1/645

(21) Application number : 56-035001

(71) Applicant : DAIICHI TOGYO KK
SHINOHARA SATOSHI

(22) Date of filing : 11.03.1981

(72) Inventor : SHINOHARA SATOSHI
FUJII NOBORU
IMADA KIYOHISA
KADOTA GENICHI
UENO HIDEO

(54) NOVEL POLYSACCHARIDE HAVING COAGULATING PROPERTY

(57) Abstract:

NEW MATERIAL A polysaccharide containing D-glucoses as the principal constituent saccharide when analyzed by methylation according to Hakomori's method, gas chromatography of a hydrolyzate, acid hydrolysis or paper chromatography; having the formula when analyzed by means of gas chromatographic mass analysis and having the following properties: absorption of C1 in the ^{13}C nuclear magnetic resonance absorption spectrum at 103ppm, characteristic absorptions at 1,720W1,760 and 890cm $^{-1}$ in the infrared absorption spectrum, number-average MW (osmotic pressure method) of 50,000W500,000, specific rotation $[\alpha]_D^{25}$ of +20W+70, elementary analysis: C 42W45% H 5.7W6.7% N 0W1% ash 0.2W0.8% O the balance, total phosphoric acid 4W6% when analyzed by fluorescent X-ray analysis, an improved Allen method, a carbon fusion method or an Eenigs-Atkins method, color reaction characteristic of saccharides in an α -naphthol/sulfuric acid reaction or a like reaction, and negative to the ninhydrin reaction or a like reaction.

USE: Coagulant, food modifier.

PREPARATION: Liquid cultivation of No.4257 bacteria of genus *Aureobacidium*, an imperfect fungus belonging to the genus of *melanobacterium*.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C);1998,2003 Japan Patent Office

⑨ 日本国特許庁 (JP) ⑩ 特許出願公開
 ⑪ 公開特許公報 (A) 昭57-149301

⑫ Int. Cl.³
 C 08 B 37/00 識別記号 庁内整理番号
 A 23 L 1/00
 A 61 K 31/715 A B Y 6580-4C
 A C R 6712-4B
 A D U 6675-4C
 G 01 N 31/00 6675-4C
 // C 12 P 19/04 6675-4C
 C 12 R 1/645 6514-2G
 6712-4B

⑬ 公開 昭和57年(1982)9月14日
 発明の数 5
 審査請求 未請求

(全 17 頁)

⑭ 凝集性を有する新規多糖

⑮ 特願 昭56-35001
 ⑯ 出願 昭56(1981)3月11日
 ⑰ 発明者 篠原智
 日向市高砂町8-14
 ⑱ 発明者 藤井昇
 宮崎市原町1-37
 ⑲ 発明者 今田清久

宮崎市大塚台西3-41-5
 ⑳ 発明者 門田元一
 日向市富高6276-83
 ㉑ 発明者 上野秀雄
 日向市財光寺608
 ㉒ 出願人 第一糖業株式会社
 東京都中央区日本橋室町1-6
 ㉓ 代理人 弁理士 篠浦清
 最終頁に続く

明細書

1. 発明の名称

凝集性を有する新規多糖

2. 特許請求の範囲

(1) 第守法に基づく、メチル化、加水分解のガスクロマト、及び酸加水分解、ペーパークロマトで、D-グルコースを主要構成糖とし、ガスクロマト質量分析(GC-MS法)で $G^1 \rightarrow : \rightarrow^3 G^1 \rightarrow : \rightarrow^3 G^1 \rightarrow = 0.38 \sim 0.43 : 0.14 \sim 0.24$: 0.38 ~ 0.43 を示し、¹³C-核磁気共鳴吸収スペクトルの測定による C₁ の吸収位置が 103 ppm であり、赤外線吸収スペクトルにおいて 1720 cm⁻¹ ~ 1760 cm⁻¹ 及び 890 cm⁻¹ に特性吸収を示し、浸透圧法による分子量測定で数平均分子量が 51万 ~ 50万 であり、比旋光度 $[\alpha]_D^{25}$ は +20 ~ +70 、元素分析直・炭素 4.20 ~ 4.50 %、水素 5.7 ~ 6.7 %、窒素 0 ~ 1.0 %、灰分 0.2 ~ 0.8 % 及び残余は酸素であり、螢光 X 線分析及び Allen 改良法、炭酸熔融、EENIGES-ATKINS 法で全燃素 4.0 ~ 6.0

%、α-ナフトール硫酸反応、インドール硫酸反応、フェノール硫酸反応で糖類の呈色反応を示し、ニンヒドリン反応、カルバゾール硫酸反応、エルソン・モルガン反応が陰性を示す。ジメチル・スルホキシド(DMBO)に可溶、水に難溶であるが、良く膨潤し、エタノール、ピリシン、クロロホルム、その他の有機溶剤に不溶な多糖。

(2) 1N・酸(亜酸)、100°C、3時間加水分解で、 $G^1 \rightarrow$ (非還元性末端)が分解遊離して $\rightarrow^3 G^1 \rightarrow$ が主結合した不溶性多糖を生じ、アルカリ処理 pH 10.0、100°C、10分で 1720 cm⁻¹ ~ 1760 cm⁻¹ の赤外吸収が消失し、イソアミラーゼ、ブルラナーゼで全く分解されず、エキソ型 β 、1、3-グルカナーゼ作用で、グルコース、ゲンチオビオースとグルコース-6-P 酸を生じるが、その加水分解率は 1 % 前後であり、更にアルカリ、酸性、ホスフアターゼで構を遊離し、又ホスホデイ、エステラーゼで構を遊離(全構に対する遊離率 50

%以下)する特許請求の範囲第1項記載の多糖。

- (3) 構成糖はD-グルコースで構造式は β , 1, 3-G結合を主鎖とし、非還元性末端が β , 1, 6-G結合で分岐し、非還元性末端は38.0~43.0%を示し、リン酸4~6%、アルカリ処理で酸性物質を遊離する特許請求の範囲第1項又は第2項記載の多糖。
- (4) 強酸、強アルカリでゲル化し、放置するとゲルは離水し、グルコース、フラクトース、シュークロースの水溶液と混合すると粘性が増加し、ゼリー状となり、エタノール濃度80%で不溶性となるが、80%以下の濃度では濃度増加で粘性は増加し、ゼリー状となり、水溶液は接着性が全くなく、乳化性が著しく、微酸性で、カオリン溶液からカオリンを凝聚させ、特に1mで1%カオリン溶液(10gr.カオリンを含む)を5分間で完全に凝聚沈殿させ、塩基性蛋白又は特定酵素を不溶化し、アルミニュームと凝聚反応し、繊維性フロッ

- 3 -

- り、螢光X線分析及びAllen改良法、炭酸熔融、EENIGES-ATKINS法で全磷酸4.0~6.0%、 α -ナフトール硫酸反応、インドール硫酸反応、フェノール硫酸反応で糖類の呈色反応を示し、ニンヒドリン反応、カルバゾール硫酸反応、エルソン・モルガン反応が陰性を示す。ジメチル・スルホキシド(DMSO)に可溶、水に難溶であるが、良く膨潤し、エタノール、ビリジン、クロロホルム、その他の有機溶剤に不溶な多糖を主成分とすることを特徴とする凝聚剤。

- (6) 箱守法に基づく、メチル化、加水分解のガスクロマト、及び酸加水分解、ペーパークロマトで、D-グルコースを主要構成糖とし、ガスクロマト質量分析(GC-MS法)で $G^1 \rightarrow : \rightarrow ^3G^1 \rightarrow : \rightarrow ^3G_1^1 = 0.38 \sim 0.43 : 0.14 \sim 0.24 : 0.38 \sim 0.43$ を示し、 ^{13}C -核磁気共鳴吸収スペクトルの測定による吸収位置が $C_1, 103$ ppmであり、赤外線吸収スペクトルにおいて $1720\text{ cm}^{-1} \sim 1760\text{ cm}^{-1}$ 及び 890 cm^{-1} に特性吸収を示し、浸透圧法による分子量測定で数平均分子量が5万~50万であり、比旋光度 $[\alpha]_D^{25}$ は+20~+70、元素分析値・炭素42.0~45.0%、水素5.7~6.7%、窒素0~1.0%、灰分0.2~0.8%及び残余は酸素であり、螢光X線分析及びAllen改良法、炭酸熔融、EENIGES-ATKINS法で全磷酸4.0~6.0%、 α -ナフトール硫酸反応、インドール硫酸反応、フェノール硫酸反応で糖類の呈色反応を示し、ニンヒドリン反応、カルバゾール硫酸反応、エルソン・モルガン反応が陰性を示す。ジメチル・スルホキシド(DMSO)に可溶、水に難溶であるが、良く膨潤し、エタノール、ビリジン、クロロホルム、その他の有機溶剤に不溶な多糖を主成分とすることを特徴とする食品改良剤。

クを形成し、その反応は純水溶液系では定量的で、その重量比は $1 : 1/40$ で Al^{+++} 以外の二、三価の無機陽イオンまた重金属とも不溶性フロックを形成し、合成高分子アニオン凝集剤の性質を示す特許請求の範囲第1項、第2項又は第3項記載の多糖。

- (5) 箱守法に基づく、メチル化、加水分解のガスクロマト、及び酸加水分解、ペーパークロマトで、D-グルコースを主要構成糖とし、ガスクロマト質量分析(GC-MS法)で $G^1 \rightarrow : \rightarrow ^3G^1 \rightarrow : \rightarrow ^3G_1^1 = 0.38 \sim 0.43 : 0.14 \sim 0.24 : 0.38 \sim 0.43$ を示し、 ^{13}C -核磁気共鳴吸収スペクトルの測定による吸収位置が $C_1, 103$ ppmであり、赤外線吸収スペクトルにおいて $1720\text{ cm}^{-1} \sim 1760\text{ cm}^{-1}$ 及び 890 cm^{-1} に特性吸収を示し、浸透圧法による分子量測定で数平均分子量が5万~50万であり、比旋光度 $[\alpha]_D^{25}$ は+20~+70、元素分析値・炭素42.0~45.0%、水素5.7~6.7%、窒素0~1.0%、灰分0.2~0.8%及び残余は酸素であ

- 4 -

性吸収を示し、浸透圧法による分子量測定で数平均分子量が5万~50万であり、比旋光度 $[\alpha]_D^{25}$ は+20~+70、元素分析値・炭素42.0~45.0%、水素5.7~6.7%、窒素0~1.0%、灰分0.2~0.8%及び残余は酸素であり、螢光X線分析及びAllen改良法、炭酸熔融、EENIGES-ATKINS法で全磷酸4.0~6.0%、 α -ナフトール硫酸反応、インドール硫酸反応、フェノール硫酸反応で糖類の呈色反応を示し、ニンヒドリン反応、カルバゾール硫酸反応、エルソン・モルガン反応が陰性を示す。ジメチル・スルホキシド(DMSO)に可溶、水に難溶であるが、良く膨潤し、エタノール、ビリジン、クロロホルム、その他の有機溶剤に不溶な多糖を主成分とすることを特徴とする食品改良剤。

- (7) 箱守法に基づく、メチル化、加水分解のガスクロマト、及び酸加水分解、ペーパークロマトで、D-グルコースを主要構成糖とし、ガスクロマト質量分析(GC-MS法)で $G^1 \rightarrow$

- 5 -

-2-

- 6 -

特徴とする分析、研究試薬。

$\text{:} \rightarrow^3\text{G}^1 \rightarrow : \rightarrow^3\text{G}_1^1 \rightarrow = 0.38 \sim 0.43 : 0.14 \sim 0.24$
 $\text{:} 0.38 \sim 0.43$ を示し、 ^{13}C - 核磁気共鳴吸収スペクトルの測定による吸収位置が C_1 , 103 ppm であり、赤外線吸収スペクトルにおいて $1720 \text{ cm}^{-1} \sim 1760 \text{ cm}^{-1}$ 及び 890 cm^{-1} に特性吸収を示し、浸透圧法による分子量測定で数平均分子量が 5万～50万であり、比旋光度 $[\alpha]_D^{25}$ は $+20 \sim +70$ 、元素分析値・炭素 42.0～45.0 %, 水素 5.7～6.7 %, 硫素 0～1.0 %, 灰分 0.2～0.8 % 及び残余は酸素であり、螢光X線分析及び Allen 改良法、炭酸熔融、BENIGES-ATKINS 法で全磷酸 4.0～6.0 %、 α -ナフトール硫酸反応、インドール硫酸反応、フェノール硫酸反応で糖類の呈色反応を示し、ニンヒドリン反応、カルバゾール硫酸反応、エルソン・モルガン反応が陰性を示す。ジメチル・スルホキシド (DMSO) に可溶、水に難溶であるが、良く膨潤し、エタノール、ピリジン、クロロホルム、その他の有機溶剤に不溶な多糖を主成分とすることを

- 7 -

硫酸反応、エルソン・モルガン反応が陰性を示す。ジメチル・スルホキシド (DMSO) に可溶、水に難溶であるが、良く膨潤し、エタノール、ピリジン、クロロホルム、その他の有機溶剤に不溶な多糖を主成分とする整腸剤その他の医薬。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、主構成糖がグルコースで、その結合様式は β -結合であり、主鎖は $\beta-1, 3$ 結合で、非還元性末端が $\beta-1, 6$ 結合で分岐し、その非還元性末端が 38.0～43.0 % であり、更には磷酸を 4.0～6.0 % 含む新規多糖に関するものであり、例えば微生物、更に詳しくは不完全菌黒色菌科 *Aureobacidiun* 属の A4257 号 (微工研寄託) が產生する細胞外、細胞壁多糖に関するものである。

本発明者等は原糖に含有されている多糖類の研究過程で、カオリン凝集活性の強い *Aureobacidiun* 属の一菌株を原糖から分離し、既存の *Aureobacidiun* 属又は *Pullularia* 属の菌株、數

(8) 箱守法に基づく、メチル化、加水分解のガスクロマト、及び酸加水分解、ペーパークロマトで、D-グルコースを主要構成糖とし、ガスクロマト質量分析 (GC-MS 法) で $\text{:} \rightarrow^3\text{G}^1 \rightarrow : \rightarrow^3\text{G}_1^1 \rightarrow = 0.38 \sim 0.43 : 0.14 \sim 0.24$
 $\text{:} 0.38 \sim 0.43$ を示し、 ^{13}C - 核磁気共鳴吸収スペクトルの測定による吸収位置が C_1 , 103 ppm であり、赤外線吸収スペクトルにおいて $1720 \text{ cm}^{-1} \sim 1760 \text{ cm}^{-1}$ 及び 890 cm^{-1} に特性吸収を示し、浸透圧法による分子量測定で数平均分子量が 5万～50万であり、比旋光度 $[\alpha]_D^{25}$ は $+20 \sim +70$ 、元素分析値・炭素 42.0～45.0 %, 水素 5.7～6.7 %, 硫素 0～1.0 %, 灰分 0.2～0.8 % 及び残余は酸素であり、螢光X線分析及び Allen 改良法、炭酸熔融、BENIGES-ATKINS 法で全磷酸 4.0～6.0 %、 α -ナフトール硫酸反応、インドール硫酸反応、フェノール硫酸反応で糖類の呈色反応を示し、ニンヒドリン反応、カルバゾール

- 8 -

10種と比較し、本分離菌が非常にカオリン凝集活性生産能が強いことを見出し、更にその培養方法を確立した。又、本物質を凝集剤として利用する研究を進め、凝集剤製造方法と凝集剤利用方法に関する開発 (特願昭52-121687) (特願昭53-097664) (特願昭53-100150)、更に、食品改質剤の開発をした (特願昭54-007816)。

上記の分離菌 (微工研に寄託、寄託番号は 4257) を使用しての凝集剤は工業規模で生産し実用に供している。本発明者等は本凝集活性物質の物理化学的特性 (高粘性、非接着性、アルミイオンとの特異的凝集性、エタノール溶液のゼリー化、酸加水分解による不溶物質生成) に注目して、その有効成分を分離し、有効成分の物理、化学的構造解明を行い、その有効成分が多糖であり、更に詳しくはグルコースを主構成糖として、その結合様式は $\beta-1, 3$ を主鎖とし、 $\beta-1, 6$ で分岐した非還元性末端が 38.0～43 %、更にはリン酸基を 4.0～6.0 % 含み、又、

アルカリ処理で酸性物質を遊離する、新規多糖であることを見出し、本発明をなすに至つた。尚、 β -1, 3結合多糖類は近年、抗腫瘍多糖として注目されている。

以下本発明をその実施例について詳しく説明する。

(1) 本発明多糖の製造並びに精製例

本発明者等が原糖から分離した前記のNo.4257号菌を液体培養し、更に詳しく述べる。炭素源（Sucrose）0.5～1.0%，N源0.1%，その他微量物質（例えばビタミン、無機質）を加え、pH 5.2～6.0、通気は培地容量の $\frac{1}{2}$ ～ $\frac{1}{3}$ 、溶存酸素1.0 ppm以下、温度20℃～30℃で通気培養すると、本発明多糖が培地中に産生される。培地の性状は黄色で卵白、ゲル状である。多糖生産濃度は0.3%前後で、産生多糖の物理的制約を受け産生濃度は規制されるが、培地組成等を特に変える事により産生濃度は0.5～0.6%にする事が可能である。

以下これを具体的に説明すると、培養は1m

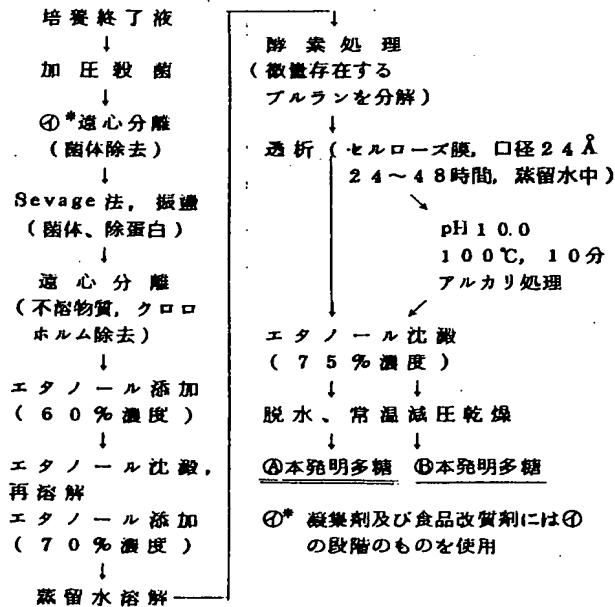
- 11 -

含んでいる。

精製例 1.

表2に示す方法に従つて上記の本発明多糖を分離精製した。

表 - 2



- 13 -

培養槽（高杉製作所）、種菌培養槽（高杉製作所）50ℓで、溶存酸素計、pH計、温度計、計測は自動記録、仕込量1mℓ、種菌量40ℓ、培養48時で、培地組成は炭素源0.5%，N源0.1%，ビタミン、無機質0.1%，pH 5.2±0.2、培養温度25℃±2℃、通気量は仕込培地容量の $\frac{1}{3}/\text{min}$ であり、培養結果を表1(A)及び第12図に示す。

表 - 1 - (A)

培養 経過 時間	pH	カオリ ン 凝集活性 ppm	新規多糖 (50%エタ ノール不溶) ppm	※① 粘 度 CP/20℃ 相対粘度	Δℓ ⁺⁺⁺ 反 応
0	5.2	0		0.1	
24	5.1	1,000	1,160	4.5	+
48	5.0	3,000	2,600	22.4	++
72	4.8	3,300	3,240	32.2	++

※① オストワルド粘度計による相対粘度

上記の培養で得られた培養液は本発明多糖を主成分とするが、培養液中に菌体、未利用還元糖（グルコース）、脂質、その他不溶性物質を

- 12 -

④ 白色纖維状

⑤ 白色纖維状（赤外分析で 1720cm^{-1} ～ 1740cm^{-1} の吸収を示さない。）

以下表2について具体的説明をする。遠心分離は菌体と不溶性固型物の除去を目的として、5,000 rpm/10 min. とし、処理液は更に完全に菌体又は蛋白、脂質を除去するために、クロロホルム、ブタノール混合液を10%加え振盪（Sevage法）し、この液を遠心処理（10,000 rpm/15 min.）し、クロロホルムと不溶物質を除去する。このとき脂質も同時に除去できる。この操作を2回くり返すと培養液は透明となり、菌体は完全に除去される。これにエタノールを添加し、エタノール濃度60%にして攪拌する。初期はゲル状になるが、攪拌することにより纖維状になる。更に70%エタノールにして物理的に脱水すると、エタノール可溶性脂質が完全に除去でき、蒸留水に溶解すると無色透明液が得られるが、多少白濁している。これは本発明多糖の物理的構造即ち溶解性に起因すると考え

- 4 -

- 14 -

られる。更に微量のアルランの混在も考えられるので分解酵素を作用させ、更に蒸留水中で透析をする。透析中、無機イオンの混在で本発明多糖が不溶性になる場合がある。透析液をアルコール沈殿（80%濃度）し、本発明多糖を分離精製した。透析後、NaOHでpH 1.0.0にし、100℃、10分、アルカリ処理をすると、赤外分析で 1720cm^{-1} ～ 1760cm^{-1} に吸収を示さない本発明多糖を得ることができる。

尚、通常のゲル沪過、物理的沪過又はイオン交換等では、本物質は精製できない物理的特性を持っている。

精製例 2.

前述の実施例で得られた培養液15ℓを110℃/10 min. 細菌し、5,000 rpm 遠心処理し、処理液14.5ℓを1ℓの分液ロートに分注し、クロロホルム、ブタノール混合液を100ml加え、常温で振盪抽出をした。抽出液を10,000 rpm/15 min. で遠心処理、クロロホルムと菌体を分離し、再度同一操作をくり返し、処理液に

-15-

1.0% (0.8%)、残余は酸素であった。

(b) 星色反応

本物質を水に溶解したものについて、各種の星色反応を試験した結果を表4に示す。

表 - 4

星色反応	星色	結果
モーリツシユ反応	紫 色	糖
α-ナフトール硫酸反応	褐 色	糖
インドール硫酸反応	黄 色	糖
フェノール硫酸反応	(定量) -	ウロン酸含有せず
カルバゾール硫酸反応	(定量) -	アミノ糖 "
エルソン・モルガン反応	-	アミノ酸 "
ニンヒドリン反応	-	アミノ酸 "

本表に示した定性、定量反応の結果から本物質は糖質であり、ウロン酸、アミノ糖又は蛋白質を含有していないことが判る。

(c) pH

本物質0.1gを100mlの蒸留水に溶解し、東亜電波HM5A型pHメータを用いてpHを測定した結果、6.5～6.6の値を得た。

-17-

エタノール（約20ℓ）を攪拌しながら徐々に添加する。蒸留水に溶解（濃度0.3%）し、pH 5.2に調整後、結晶ブルラナーゼ（SIGMA社製）を添加、30℃/24時間攪拌後、セルローズ膜で透析、水道水の場合、不溶性物質ができる。透析後エタノールを添加（40ℓ）、24時間放置後不溶物質を分離、常温減圧乾燥し本発明多糖とした。

表 - 3

供試料	新規多糖（固型 培養液15ℓ→物）448

得られた本発明多糖は白色繊維状の無味無臭な物質である。

(d) 本発明物質の物理的並びに化学的性質

(i) 元素分析値

本物質の元素分析を柳本製作所製CHN-CORDER MF 2型を用いて行つた結果、炭素42.0～45.0% (43%)、水素5.7～6.7% (6.4%)、灰分0.2～0.8% (0.6%)、窒素0～

-16-

(ii) 比旋光度

本物質を0.2%の水溶液にして、旋光度をJASCO J-20A自己旋光分析計にて測定し、その測定値より比旋光度 $[\alpha]_D^{25}$ を求め、+20°～70° (40°) の範囲の値を得た。

(iii) 分子量

本物質の数平均分子量をZimm-Myerson型浸透圧計（セル）を用い、セロファン半透膜を用いて測定した結果、数平均分子量は100,000～500,000 (373,000) であつた。又、水溶液の極限粘度は25℃において $[\eta] = 1.0 \sim 3.5$ (2.40) であつた。

(iv) 溶解性

本物質は水に極めて良く膨潤するが、少量の不純物の共存によつてしばしば凝固する。本物質の凝固を起す物質は、エタノール、硫酸バンド、塩基性高分子電解質などである。本物質はクロロホルム、ベンゼン、ヘキサン、ピリジン等に不溶であるが、水を含んだエタノールにはよく膨潤する。但し、70%以上

-5-

-18-

のエタノール濃度においては不溶性ゲルが沈澱する。

本物質を10~100倍容以上の水に膨潤させると、ほぼ均質なゲルを得る。以下この様な均質なゲルを本物質の水溶液と呼ぶことにする。

(I) 赤外線吸収スペクトル

本物質の水溶液を乾燥して得たフィルム状又はKBr錠剤法による赤外線吸収スペクトルは、第1図(A)に示す如くであり、アルカリ処理することにより第1図(B)の如くなり、その差が認められた。これより明らかのように、 $3600\sim3100\text{ cm}^{-1}$, $2950\sim2920\text{ cm}^{-1}$, $1760\sim1720\text{ cm}^{-1}$, $1600\sim1680\text{ cm}^{-1}$, $1400\sim1480\text{ cm}^{-1}$, $1340\sim1390\text{ cm}^{-1}$, 1320 cm^{-1} 及び $1200\sim1000\text{ cm}^{-1}$, 890 cm^{-1} の近傍にそれぞれ吸収が認められた。尚、測定は日本分光社DS-701型で行つた。

第1図において $3600\sim3200\text{ cm}^{-1}$ のブロードな吸収は、種々の度合に水素結合したOH

-19-

着性、接着性を示さず、見掛けは生卵白状を示し、水溶液中で1%濃度になると本物質はゲル状になり、水に溶解が困難である。本物質の0.1%水溶液にエチルアルコールを添加して、順次、アルコール濃度を増加させると、本水溶液の粘性は増加しゼリー状となる物性的特長を示す。この特長は非還元性末端基に、又は分岐した架橋構造によると推定される。即ち本物質中の非還元末端基は38~43%もあり、他の高分子多糖類に比較して非常にその含有量の多いのが特長である。

(II) 水、アルコール混合系における本物質の粘性測定

精製した本物質の粉末を蒸留水に溶解して0.5%濃度を作り、表5の如き水、アルコール混合系濃度の本物質濃度を調整し、良く攪拌してB型回転粘度計でその粘性を測定した。その結果を第2図に示す。

第2図に明示した如くアルコール濃度60%で粘性は最大となり、アルコール無添加時

に由来するものと考えられる。この吸収は試料の糖質部の水酸基を-O-メチル化すると減少、或いは消失することになる。又、 $1200\sim1000\text{ cm}^{-1}$ のブロードな吸収は、糖質部のピラノース環C-O-C結合の非対象伸縮振動によると考えられる。又、 $1720\sim1760\text{ cm}^{-1}$ はエステル基C=O伸縮振動、-COOH非イオン性を、 890 cm^{-1} は糖の δ 結合を示していると思われる。アルカリ処理で $1720\sim1760\text{ cm}^{-1}$ の吸収は消失し、メチル化により $1720\sim1760\text{ cm}^{-1}$, $1250\sim1280\text{ cm}^{-1}$ の吸収も消失する。尚、 $1760\sim1720\text{ cm}^{-1}$ のカルボニル基C=Oに特有の吸収は、糖部分に有機酸がエステル結合、その他(カルボキシル基の他に水酸基を有する酸の場合は、ケタール結合によるなど)により結合したものに由来すると考えられる。

(II) 物性特性

(1) アルコール水溶液における特性

本物質の水溶液(0.1%)は高粘性で、粘

-20-

の5倍の粘性、即ち0.1%の水溶液が410(CP/20℃)となり、ゼリー状となる。このゼリーは酸性多糖として良く知られているベクチン酸と砂糖との混合によるゼリーとは、その見掛け物性は全く異なっている。即ち本物質のゼリーはやわらかく、粘着性が全くなく、のびが非常に良い。この物性は化粧品の基礎ベース、又はエタノールを含むゼリー食品、その他種々の加工原料に本発明多糖が有用であることを示唆している。

表 - 5

新規多糖濃度	0.1%	"	"	"	"	"	"	"
溶 水	90	80	70	60	50	40	30	20
エタ ノール	10	20	30	40	50	60	70	80
CP/20℃	85	90	92.5	105	115	410	225	-

(4) 凝集性

本物質を含む培養液又はその水溶液は、カオリソ浴液に対し著しい凝集活性を示し、又アルミニュームイオンと定量的に反応して特

長ある纖維性フロツクを瞬時に形成する。更には、アルミニュームイオンを含む水溶液に本物質を含む水溶液を添加すると、瞬時にゲル化してコンニヤク状になり、纖維性フロツクを形成せず、凝集活性を示さなくなる。又、合成高分子カチオンと混合すると本物質は強固なフロツクを形成すること、又、高分子合成アニオノンには任意に混合することから、アニオノン凝集剤的性質をもつてていることが容易に推察できる。第3図に本物質とカオリン溶液との凝集反応結果を示す。これは、本物質培養製造における溶液中の凝集力価測定法の物指であり、本物質を正確、敏速に微量の単位(ppm)で測定する分析法で、本発明者が確立した分析法である。又、本分析法は本物質の生産菌をスクリーニングするための分析として使用した。

この第3図(条件: 1%カオリン溶液搅拌後、5分静置、pH 3.5、室温)は、本物質1mgが1%カオリン溶液(10grカオリンに相

当)を5分間で完全に凝集沈降させることを示している。

凝集試験(1)

カオリン5%溶液を凝集試験供試液とし、500mlのピーカーに400ml分取し、シャー、テスターを使用して試験した。測定反応条件はpH 4.6、搅拌30 rpm/min.、温度常温で、各凝集剤は1,000 ppm水溶液として使用した。第4図にその結果を示す。第4図に示した如く本物質のフロツクは纖維状で、沈降速度が大であり、従来の合成高分子凝集剤と比較すると凝集力が数倍強い。

本物質とAl⁺⁺⁺との反応性についての試験結果を表6に示す。Al⁺として硫酸アルミニュームを使用した。表6の比率でアルミニュームイオンを添加し、搅拌後、5,000 rpm/10 min.遠心処理し、沈降物質を水、エタノールで水洗後、減圧乾燥して秤量し、添加アルミニュームに対する比率を求めた。

- 23 -

表 - 6

添加 アルミニ ューム 量	本発明多糖 100mg 100ml	Al ⁺⁺⁺	Al ⁺⁺⁺ によ る凝集多糖 重量	残 留 凝 集 活 性
		本 発 明 多 糖 重 量 比		
1	1	1/100	40mg	+
2	2	1/50	80	+
2.5	2.5	1/40	100	-
3	3	1/30	103	-
4	4	1/25	104	-
5	5	1/20	105	-

Al⁺と本発明多糖の重量比率が1:40以下の場合は、本物質は完全に不溶性となるが、1:50の場合、20%が未凝集として残る。表6からAl⁺と本物質の反応比率は1:40である。即ち、本物質の水溶液に本物質に対して重量比率でAl⁺を1/40添加することにより、本物質を完全に凝集して不溶性にすることができる。

(II) 構造的特長

(A) 本物質の構成単糖

- 24 -

試料10mgを50mlのナス型フラスコにとり、0.5mlの72%硫酸を加え、30℃で30分搅拌し、可溶化する。可溶化したものに4mlの水を加え、110℃で3時間加水分解し、これを炭酸バリウムで中和し、硫酸バリウムを遠沈除去し、上澄液を5mlに減圧濃縮し、それに30mgの水素化ホウ素ナトリウムを加え4時間室温にて放置し、還元してアルシトールとする。それに5%酢酸を加え、過剰の水素化ホウ素ナトリウムを分解し、減圧乾固する。それに1mlのビリシンと1mlの無水酢酸を加え、110℃で3時間アセチル化を行い、終了後10mlの水を加え、減圧乾固する。この操作を3回行い、過剰のアセチル化試薬を除去し、クロロホルムに溶解し、ガスクロマトグラフィにより測定した結果、糖含有量は9.0~9.5%であり、糖質のうち9.8%以上がグルコースで、マンノース、ガラクトースは合計2%以下であった。低純度の本多糖はガラクトース、マンノースを合計

- 25 -

- 7 -

- 26 -

5%含有していたが、精製して純度を高めたものは、ガラクトース、マンノースとともに痕跡であつた。第5図にガスクロマトグラムを示す。

尚、本物質の0.1%水溶液を1N, H₂SO₄で5時間/100℃加水分解し、常法により中和、濃縮してペーパークロマトで構成糖を調べた結果、グルコースのみを検出した。

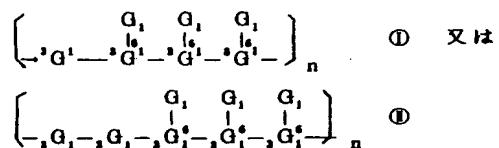
ペーパークロマト展開剤、ブタノール、ピリジン、水、6:4:3。展開2.5cm、2回、発色剤A.H.P.を使用した。低純度の本物質の場合、痕跡のガラクトース、マンノースを検出する。

(iv) 糖の結合様式

糖の結合様式の決定は箱守法によるメチル化によつて行つた。即ち、試料5.0mgをジメチルスルホキシド1.0mlに加え、60℃で1時間攪拌し溶解する。この溶液を窒素気流下で20℃～30℃に保ち、攪拌し、メチルスルフィニルカルバニオンを2ml加え、3時間反

- 27 -

コース)の結合様式を明記すると、下記の構造①、②になる。



(v) ¹³C-NMR(炭素核磁気共鳴)吸収スペクトル

日本電子製 FX-60型フーリエ変換式核磁気共鳴吸収装置を用い、¹³C核の磁気共鳴吸収スペクトルの測定を行つた。試料は、予め箱守法でメチル化したものと重クロロホルムに溶かし、テトラメチルシラン(TMS)を内部標準とした。測定周波数は15.1MHzである。

その結果を第8図に示す。この図の中で、60～80ppmの吸収はピラノース環の2～6メトキシル基の炭素によるものと、重クロロホルムの三重線(75.1, 77.2, 79.2ppm)が重疊したものであるが、103ppm付近に

応させ、その終了後、ヨウ化メチル1mlを加え、1時間反応させ、メチル化を終了する。

反応液を一晩流水で透析し、透析膜内液をクロロホルムで抽出後、クロロホルム層を減圧乾固し、メチル化多糖を得る。得られた多糖を、赤外吸収スペクトルで測定し、3400cm⁻¹のOH吸収の消失により、メチル化を確認する。メチル化不充分の場合は再び同様の操作でメチル化する。得られたメチル化糖をアルギトール、アセテートとし、ガスクロマトグラフィー(GLC)及び質量分析計(Mass)によりピークを同定し、ピーク面積によりモル比を求めた。その結果、2,3,4,6-O-Me-G(メチルグルコース)(G¹) : 2,4,6-O-Me-G(-G¹) : 2,4-O-Me-G(-G¹) = 3:1~2:3であつた。第6図に上記のガスクロマトグラムの結果を示す。尚、本分析で G¹, -G¹ が検出されるが、その含有量は1%前後である。

上記分析結果から推定される構成糖(グル

- 28 -

コース)に観測される吸収は β に配向したグリコシド結合によるものである。尚、90～100ppm付近に α -アノマーの吸収が見られないことから、本物質においては(1-6)結合も(1-3)結合も β -配向したものであることがわかる。

比較として、 β 配向したメチル化ブスツラン及び α -配向をしたメチル化デキストランを、第9図及び第10図に示した。

(vi) 酸又は酵素分解

本物質を1N(硫酸, HC1, H₂SO₄)、100℃で加水分解すると、3時間以上で不溶性物質が完全に凝聚して来る。この加水分解によつて生じる不溶性物質を分離して、常法により構成糖、結合様式を調べると、構成糖はグルコースのみで、結合様式は $\rightarrow^1\text{G}^1\rightarrow$ が主で $\text{G}^1\rightarrow$ がほとんど消失している。即ち、非還元性末端が非常に少なくなつており、1,6結合が優先的に分解されていることを示している。第7図にそのガスクロマトグラムを

- 29 -

-8-

- 30 -

示している。

前述の如く、本物質の ^{13}C 核磁気共鳴スペクトル又は GC-MS 分析等から、本物質が β , 1, 3 結合を主鎖とし、非還元性末端が β , 1, 6 結合で分岐し、非還元性末端を 38% ~ 43% 含有する β , 1, 3 グルカンであることは明らかであるが、本発明者等は本物質に対する酵素作用、即ち *Basidiomycetes* から分離した Sigma 社製（商品名・Lysing Enzyme）エキソ型 1, 3, β -グルカン・グルコヒドラーゼ（グルカナーゼ、還元末端からグルコース β , 1, 3 結合を順次分解する酵素、例えば、グルコースの β , 1, 3 結合のみからなるラミナリンからグルコースのみを生成する）を作用させて、ペーパー・クロマトで分解糖を調べ、グルコース、ゲンチオビオース（グルコースが β , 1, 6 で結合した二糖類）とグルコース-6-磷酸を検出したが、基質の分解率はグルコース換算で 1% 以下であつた。本酵素による本発明多糖の分解率が非常に低

- 31 -

% になる。分解液中には、グルコース、ゲンチオビオース、更に三、四糖のオリゴ糖とグルコース-6-磷酸、50% エタノールで沈殿する多糖に分解される。

ペーパーで検出されたグルコース、ゲンチオビオースの発色スポットから推定しても、ゲンチオビオースはグルコースに比較して多い。本培養液中に含有される酵素はグルコース、ゲンチオビオースを生成することから、エキソ 1, 3, β -グルカナーゼ、又は粘性低下と 3, 4 糖のオリゴ糖、更には 50% エタノールで沈殿する多糖を生じることから、エンド 1, 3, β -グルカナーゼの両酵素が含まれており、更には、本物質を特異的にマクロに分解する酵素も含有されていると考えられる。いずれにしても、本発明多糖にエキソ β , 1, 3 グルカナーゼ、エキソ 1, 3, β -グルカナーゼとホスファターゼ、ホスファターゼと新規に分離した細菌培養液等の組合せ酵素で、ゲンチオビオース、グルコース-6-磷酸、グル

い原因是、①本物質の物理的構造にあると考えられる。即ち、水溶液中で本物質はミクロ的には（超遠心分離、分析的には）ゲルを形成し、酵素が基質に親和できないため一部可溶化した表面多糖のみが分解されるのか、又②本物質に含まれる磷酸基又はアルカリ性で遊離する酸性物質に、本酵素がブロックされることなどが考えられるが、後者の原因、即ち酸性物質をアルカリで除去した本物質について酵素分解率をみたが、変化はない。更にホスファターゼを作用させ磷酸を 30~40% 除去した本物質について酵素分解率をみたが、多少（1% 以上）上昇しているが、その分解率は低い。又、酵素作用後の水溶液の相対粘度はほとんど変化していない。本発明者等が本発明多糖を炭素源として新規にスクリーニングした細菌の培養液（菌体を除去した培養液）を本物質に添加し、更にホスファターゼを添加し、微アルカリ（pH 8.3）で作用させると粘性は低下し、本物質の分解率は數 10

- 32 -

コースを生じることから、化学、物理的分析から得られた本発明多糖の骨格構造（構成グルコースの結合様式）と酵素的分解知見が一致する。即ち、本発明多糖の骨格構造はグルコースが 1, 3, β 結合した主鎖と非還元末端が β , 1, 6 結合で分岐した高分子多糖で、磷酸の一部は、グルコース-6-磷酸として本多糖中にエステル結合していると考えられる。

酵素的分解例

精製した粉末の本発明多糖を蒸留水に溶解して 0.1% とし、これを基質とした。作用酵素については、エキソ 1, 3- β -グルカナーゼは SIGMA 社製で *Basidiomycetes* から分離した酵素で、商品名 Lysing Enzyme、ホスファターゼは P.L.-Biochemical 社製のアルカリ、酸性ホスファターゼ、又はホスホディエステラーゼ等を使用した。新規分離菌については培養液を直接使用（炭素源として 0.1% の新規多糖、N 0.1%、pH 8.2、温度 35°C で培養し、10,000 rpm で菌体分離した培養液）、

- 33 -

-9-

- 34 -

作用条件は、Lysing Enzyme：温度 50 ℃、pH 5.0、酵素 10 mg/20 ml にして 1 ml/250 ml 基質に添加（本酵素は 1, 6, β 結合の側鎖を bypass する）、アルカリ、酸性ホスファターゼの作用条件は温度 35 ℃、pH 5.2、pH 8.2、酵素量各 0.02 ml (1 mg/1 ml) 添加、作用時間 72 h。分解液は 50% エタノールで不溶物質を除去して濃縮後、ブタノール：ピリシン：水 = 6 : 4 : 3 で展開、50 cm (25 cm 2 回)、A.H.P で発色した。

表 7 にその結果を示す。

表 7

使用酵素名	作用時間	分解率	ペーパークロマトによる 分解糖の検出	
			相対粘度 / 20 ℃ 未処理液を 1.00 としての比率	
①エキソ-β-1, 3 グルカナーゼ (Lysing Enzyme)	7.2	1% 以下	9.5 ~ 9.9	・グルコース ・ジンチオビオース ・グルコース - 6 - 煙酸
②アルカリ・ホスファターゼ Lysing Enzyme	7.2	1% 以上	9.0 ~ 9.5	・グルコース ・ジンチオビオース ・グルコース - 6 - 煙酸
③アルカリ・ホスファターゼ 新しく分解した糖(細 菌)の培養液	7.2	20 ~ 30%	1.0 以下	・グルコース ・ジンチオビオース ・四糖(オリゴ糖) ・5.0% アルコールによ る沈澱多糖

- 35 -

- 36 -

4) 本発明多糖中の磷酸

本発明多糖中の全磷を Allen の改良法又は炭酸熔融後 EENIGES-ATKINS 法で比色定量すると、本発明多糖中には磷 (PO₄) が 4 ~ 6 % 含有されており、又、螢光 X 線分析、酵素分解でも磷 (PO₄) が含有されていることが明らかとなつた。一般に磷酸含有高分子多糖はマンナン及びガラクタン等について報告されているが、α ~ β, glucum (グルカン) については、澱粉を除いては (多糖澱粉中の磷酸含有量は 0.1% 以下であり) 報告されていない。本発明多糖中の磷酸含有量は精製純度によって変化しないが、培養条件によってその含有量が多少変動する。

新規多糖を 1N HCl、100 ℃ で加水分解すると、磷酸が遊離する。更に加水分解において不溶性となつた多糖中の磷酸を調べると、その含有量は痕跡となつてている。1N NaOH、100 ℃、10 分 ~ 30 分 のアルカリ処理した本発明多糖中の磷酸は、処理前と変わらない。

又、本発明多糖の 0.1% 水溶液を、酸性又はアルカリ性ホスファターゼ又はホスホデイエステラーゼ等で処理すると、磷酸が遊離して来るが、その分解率は多糖中の全磷に対して最大 50% である。又、エキソ-β-1, 3 グルカナーゼと本酵素を組合せても、その分解率は 50% 以上にはなりにくい。分解率に限界があるのは本発明多糖の物理的構造によると判断される。メチル化多糖中には磷酸は含有されていない。エキソ型 β-1, 3 グルカナーゼで処理すると、本酵素で分解される部分から、グルコース-6-磷酸がペーパークロマトによって検出された。上記分解知見から、即ち酵素処理、酸処理の結果、本発明多糖中の磷酸は一部グルコース-6-磷酸となつており、又、ジエステル結合している磷酸の存在も考えられる。磷酸含有量を主構成糖 (グルコース) とモル比で示すと、磷酸 (PO₄) : グルコース = 1 : 8 ~ 12 となる。第 11 図に、本発明多糖 0.1% 水溶液のホスファター

セによる磷酸遊離率を示す。更に表8に分析結果を示す。

表 - 8

供試サンプル	炭酸熔融後 EENIGES- ATKINS法 含有量	アルカリ性又は酸性 ホスファターゼ処理		螢光 X線法 含有量
		含有量	遊離率	
新規多糖 (精製)	4~6%	2~3%	50%	+++
未Sevag, 未透析 (未精製)	4~6%	2~3%	50%	+++
酸加水分解残	trace	trace		±
アルカリ処理	4~6%	2~3%	50%	+++
メチル化多糖	-	-		-

以上のことから、本発明多糖中に磷酸が糖と結合して含有されていることは明らかであり、本物質の特長の一つは、 β , 1, 3 グルカンに高含有量で磷酸が含まれていることである。

(v) 亜急性毒性

本発明多糖の急性、亜急性毒性試験を実施し

- 39 -

2. 血液関係所見：いずれの値についても差はみられなかつた。
3. 病理学的所見：肉眼的観察、病理組織学的観察のいずれにおいても、著変は認められなかつた。

以上明らかなように、本発明多糖は凝集剤、食品改質剤、整腸その他の医薬として有用な新規物質であるが、その他本発明は、ジャム、マーマレード、マヨネーズ、サラダドレッシング、ケチャップ、ジュース、スープ、ソース、醤油、食アン、ゼリー、アイスクリーム、ヨーグルト、コーヒー牛乳、チヨコレート、ビール、清酒、洋酒、ソーセージ、ハム、チクリ、カマボコ、メン類、インスタント食品、さらに食品の可食性の包装フィルムなどの用途が考えられ、又、代用血漿、血液凝固阻止剤、角膜治療剤、抗腫瘍性物質のような医薬的な用途も考えられる。さらに化粧品添加用、製紙工業用、織物工業用、石油油田さく井用その他の潤滑剤、凍結安定剤、浮遊選鉱用液、消防液助剤、土壤改良剤、

た。結果を示す。

実験動物：Wistar系成熟雄及び雌ラット、13週令より実験に供した。

実験方法：A群 2.5 mg/kg BW/Day、B群 2.5 mg/kg BW/Day の用量で各群雌雄各 10匹を使用、連口ゾンデにより経口投与を 7週間行つた。対照群は代りに水道水を投与した。体重測定及び健康状態の観察は経口投与時に行つた。実験開始前及び終了直前に採血し、ヘマトクリット値、赤血球数、白血球数及び白血球の分画比を測定した。経口投与終了（8週間目）ラットを麻酔下で放血し、肉眼的観察と主要臓器について病理組織学的に検索した。

結果及び考察：

1. 体重変化について、DT剤投与期間中、各群とも成長曲線には著変はみられず、実験開始前と終了時の体重には各群とも有意の差はみられなかつた。

投与期間中、健康状態にも著変はみられなかつた。

- 40 -

錠剤被覆用、建築用、陶器用などへの利用も考えられる。

4. 図面の簡単な説明

第1図(A)は本発明多糖の赤外吸収スペクトルを示す。第1図(B)はアルカリ処理した本発明多糖の赤外吸収スペクトルを示す。第2図は本発明多糖の水、アルコール混合系における粘性を示す。第3図は本発明多糖のカオリン凝集活性と、その力価測定法を示したものである。第4図は本発明多糖の凝集活性と合成高分子剤の凝集活性とを 5% カオリン溶液について比較したものである。第5図は本発明多糖の完全加水分解物のアルギトールアセテート分析のガスクロマトグラムで、ピーク9は内部標準のイノシトールであり、本発明多糖の主成分はピーク8のグルコースであり、他に極めて微量のピーク6のマンノース、ピーク7のガラクトースを含んでいる。ガスクロマトグラムの測定条件は、キャリアガスに N₂ を用い、流量 180 ml/min であり、カラム 2.1 m (L) × 3 = (φ)、充填材は

- 41 -

-11-

- 42 -

ECNSS-M 5%、サポート chromosorb-W、60/80メッシュを用い、温度170°Cで実施した。第6図は本発明多糖のメチル化アルジトールアセテート分析におけるガスクロマトグラムであり、ピーク1, 2, 3, 4, 5はそれぞれ2, 3, 4-O-Me-G、2, 4, 6-O-Me-G、2, 3, 4-O-Me-G、2, 3, 6-O-Me-G、2, 4-O-Me-Gを示す。キャリヤガスにN₂を用い、その流量は30 ml/minであり、カラムは2.1 m × 3 mm、充填材は0.3% OV-275 + 0.4% GEXF 1150、サポート shumalite-W、80/100メッシュ、温度140°Cで実施した。第7図は本発明多糖を1N-硫酸で5時間部分加水分解したときの、その未分解多糖のメチル化アルジトールアセテート分析のガスクロマトグラムで、第6図に比べ、ピーク1と5が減少し、ピーク2が増加している。これは非還元末端が遊離していることを示している。ガスクロマトグラムの測定条件は第6図と同じ。第8図は本発明多糖をメチル化したものの中クロロホルム溶液の

¹³C-NMRを示す。比較として、第9図、第10図にβ-配向のブスツラン及びα-配向のデキストランのメチル化物、重クロロホルム溶液の¹³C-NMRを示す。第11図はアルカリホスファターゼによるリン酸の経過時間における全リン酸に対する遊離率を示す。第12図は本発明物質の培養方法による凝集を示す図表である。

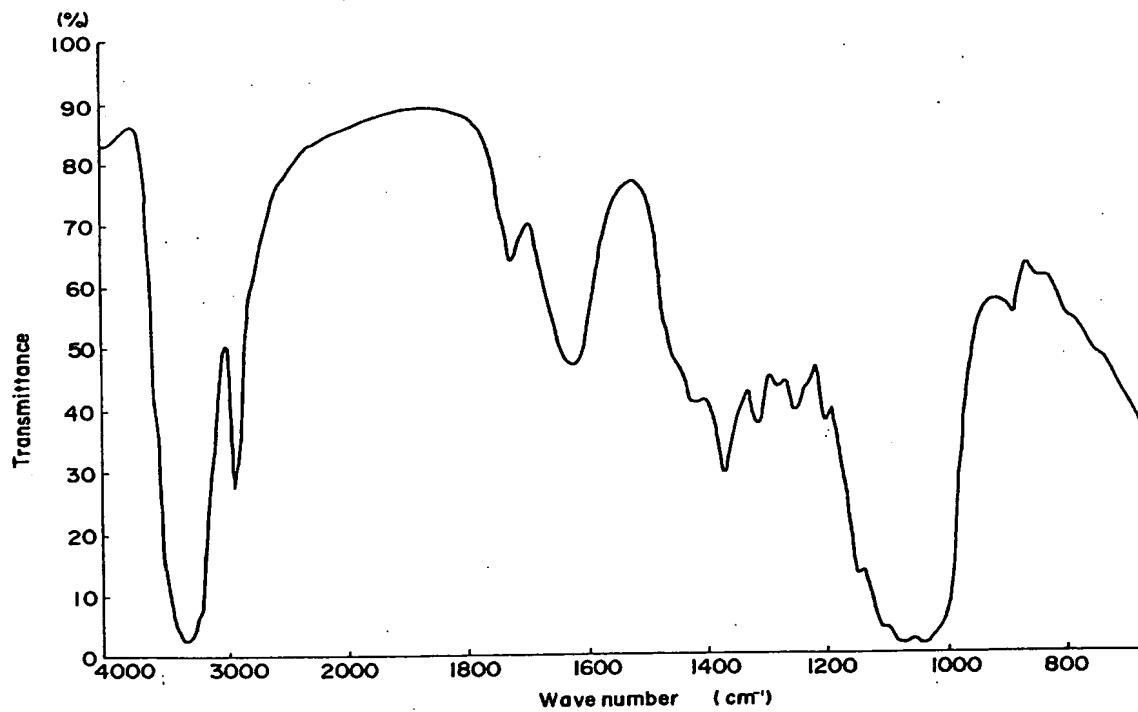
代理人 箕浦



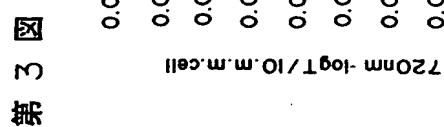
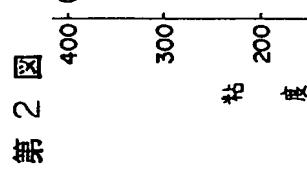
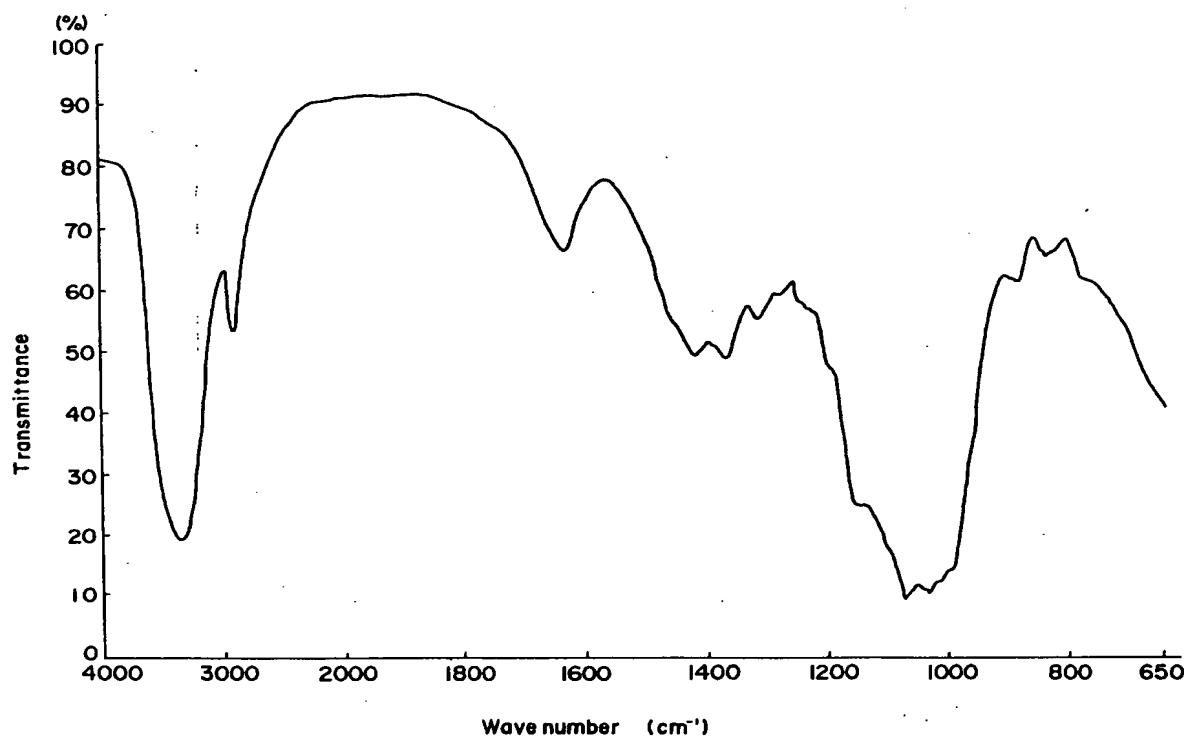
- 43 -

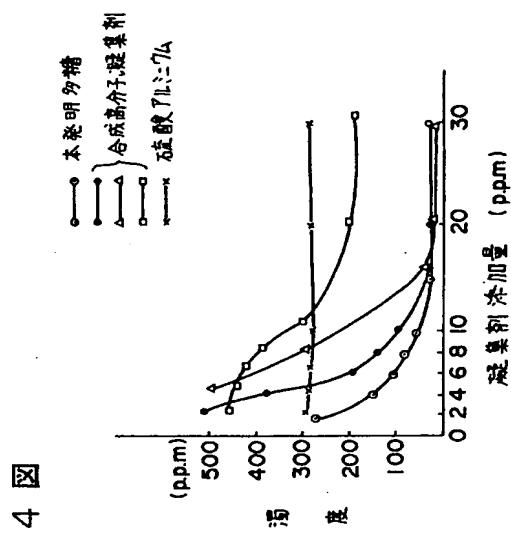
- 44 -

第1図 (A)

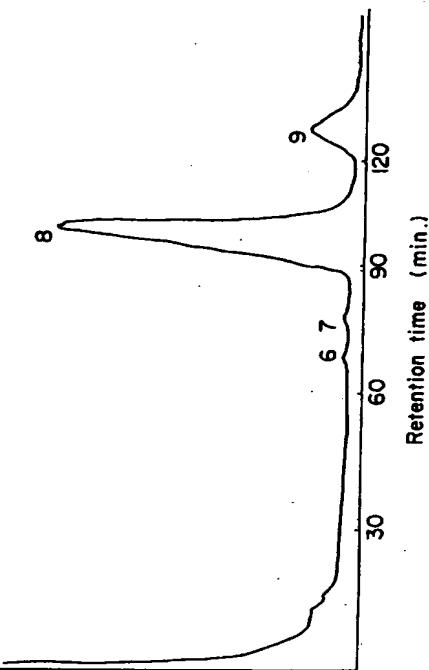


第1図(B)

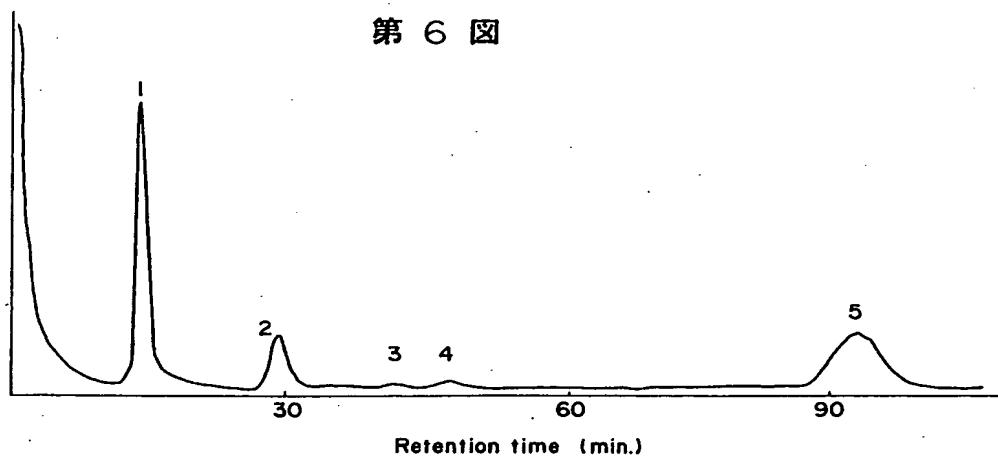




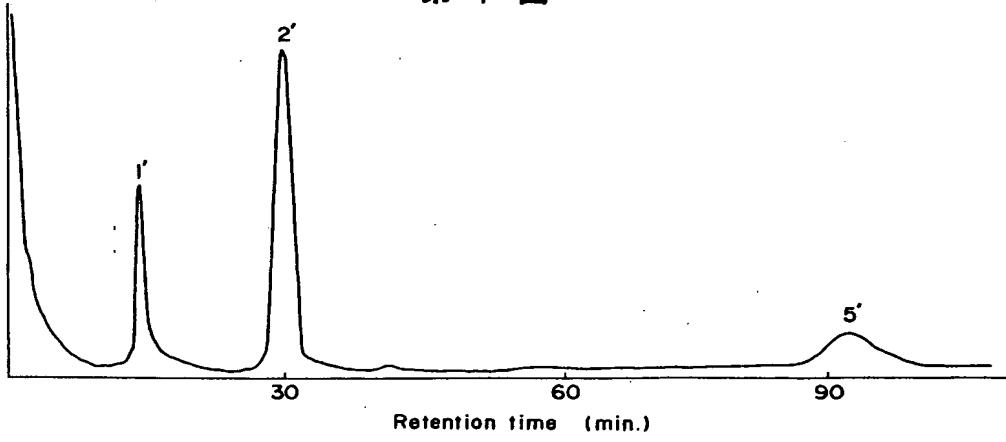
第5図



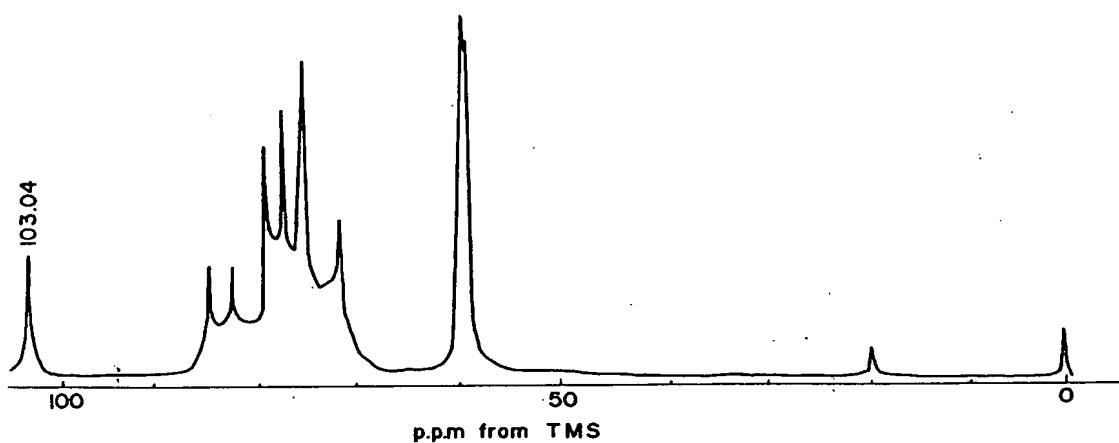
第6図



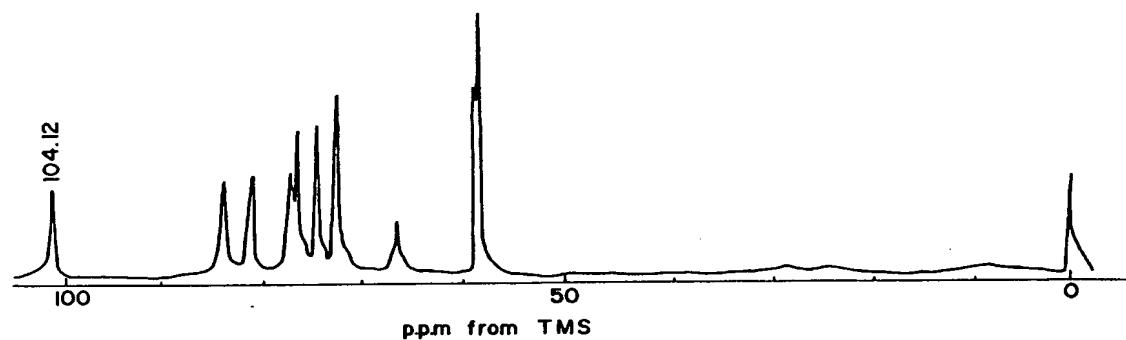
第7図



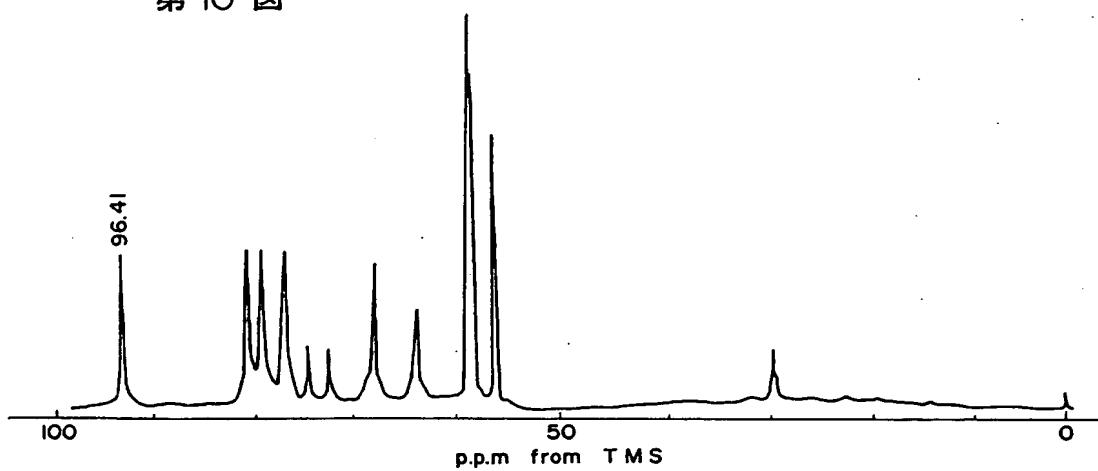
第 8 図



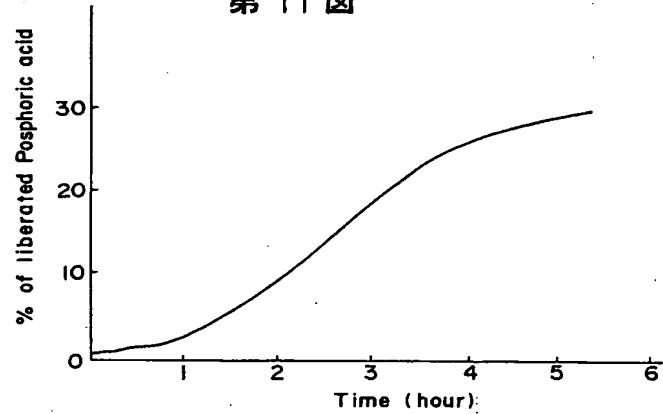
第 9 図



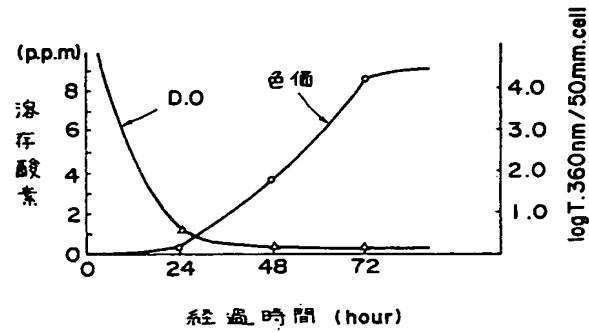
第10図



第11図



第12図



特開 昭57-149301 (17)

第1頁の続き

⑦出願人 篠原智

日向市高砂町 8-14